

上皮間葉形質転換関連遺伝子LIV-1の膀胱癌進展への関与

著者	海野 純
号	78
学位授与番号	2647
URL	http://hdl.handle.net/10097/45873

氏 名（本籍）	うみ 海	の 野	じゅん 純
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 2 6 4 7 号		
学位授与年月日	平 成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻		
学 位 論 文 題 目	上皮間葉形質転換関連遺伝子 LIV-1 の膀胱進展 への関与		

	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教授 下瀬川	徹	教授 笹 野 公 伸
	教授 佐々木	巖	

論文内容要旨

背景

癌の浸潤・転移能獲得機序において、上皮間葉形質転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) が重要な過程であると考えられている。亜鉛輸送体 LIV-1 は STAT3 の下流標的分子で、EMT の制御分子である Zinc-finger transcription factor Snail の核内移行に必須であることが明らかにされた。STAT3 の活性化がヒト膵癌においても増殖浸潤に関与していることから、膵癌進展への LIV-1 の関与が示唆されるが、膵癌進展における LIV-1 の関与についてはこれまで報告がない。

方法

real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて、9つの細胞株 (8 癌細胞株, 1 正常膵管上皮細胞株) と膵組織 24 例 (癌 12 例, 正常組織 12 例) の LIV-1 mRNA 発現レベルを検討した。72 例の膵癌組織で免疫染色を行い、LIV-1 蛋白の局在部位を確認し、発現レベルと臨床病理学的因子との関連を検討した。膵癌細胞株 Panc-1 に LIV-1 siRNA 発現ベクターを安定導入し、LIV-1 の機能解析として *in vitro* では直接計測および BrdU assay により細胞増殖能, soft agar assay により足場非依存性増殖能, scratch assay により細胞運動能を, *in vivo* ではヌードマウスへの皮下移植および同所移植によって腫瘍形成能, 浸潤転移能を検討した。さらに LIV-1 発現抑制細胞における EMT 関連分子の発現および局在変化を検討した。

結果

6つ (75%) の膵癌細胞株で正常膵管上皮細胞株より LIV-1 mRNA 発現が高く、Panc-1 で最も高発現であった。また、膵癌組織での LIV-1 mRNA 発現は正常組織よりも有意に高発現であった ($P < 0.01$)。免疫染色では、膵癌の 76.4% で LIV-1 発現がみられ、LIV-1 発現レベルは最大径 50 mm 以上の腫瘍 ($P = 0.044$) とリンパ管浸潤 ($P = 0.023$) に関連があった。LIV-1 は細胞膜ではなく細胞質に局在した。LIV-1 発現抑制細胞は、*in vitro* では細胞増殖, 足場非依存性増殖, 細胞移動能が有意に抑制され、*in vivo* では腫瘍形成と転移が有意に抑制された。さらに、LIV-1 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比べ上皮様形態を強く示し、Snail の核内発現が減少し、E-cadherin 発現の増加と細胞膜への強い局在を示した。

結 論

(1) LIV-1 mRNA は多くの膵癌細胞株で正常膵管上皮細胞株より強く発現しており、膵癌組織の LIV-1 mRNA 発現は正常組織のそれよりも有意に高かった。(2) 膵癌症例の 75%以上で LIV-1 発現がみられ、LIV-1 発現はリンパ管浸潤 (ly) と最大径 50 mm 以上の腫瘍に関連があった。(3) 膵癌細胞で LIV-1 発現を抑制すると、*in vitro* で細胞増殖、足場非依存性増殖、細胞移動能をすべて抑制し、*in vivo* では腫瘍形成および転移が抑制された。(4) 膵癌細胞で LIV-1 発現を抑制すると、膵癌細胞の EMT は阻害され、上皮細胞様形態変化を示し、上皮性マーカーの発現が強くなった。

以上の結果から、LIV-1 は上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、ヒト膵癌の進展に関与していることが考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

膵癌は臨床的に著しい浸潤傾向のために極めて予後不良であることが知られているが、その分子生物学的な背景については未だ完全には明らかにされていない。本研究の目的は上皮間葉形質転換 (Epithelial to mesenchymal transition : EMT) 関連遺伝子 LIV-1 の膵癌における機能について検討することである。LIV-1 は転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) の下流標的分子で、EMT に重要な役割を演じている Snail の核内移行に必須であることが明らかにされている。しかしながら、膵癌進展における LIV-1 の関与についてはこれまで報告がない。

まず、Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて、9 つの細胞株 (8 癌細胞株、1 正常膵管上皮細胞株) と膵組織 24 例 (癌 12 例、正常組織 12 例) の LIV-1 mRNA 発現レベルを検討した。膵癌細胞株と膵癌組織は、それぞれ正常膵管上皮細胞株および膵正常組織よりも LIV-1 mRNA の発現が高かった。つづいて 72 例の膵癌で免疫染色を行い、LIV-1 蛋白の発現レベルと臨床病理学的因子との関連を検討した。免疫染色では、膵癌の 76.4% で LIV-1 発現がみられ、LIV-1 発現レベルは 50 mm 以上の腫瘍とリンパ管浸潤に有意に関連があった。さらに、膵癌細胞株 Panc-1 において LIV-1 siRNA を安定発現させ発現抑制株を作成することによって、膵癌細胞における LIV-1 の生物学的効果と EMT への関与を検討した。LIV-1 発現抑制細胞では、in vitro では細胞増殖、足場非依存性増殖、細胞移動能が有意に抑制され、in vivo では腫瘍形成と転移形成が有意に抑制された。加えて LIV-1 発現抑制による EMT マーカーの変化を検討し、LIV-1 発現抑制細胞では EMT の主要な制御因子である Snail の核内発現が減少し、上皮性マーカーである E-cadherin 発現が増加することを明らかにした。これらの分子変化は、LIV-1 発現抑制によって Panc-1 細胞が間葉系形質から上皮形質へ移行していること、つまり EMT の逆転換が生じていることを示している。

以上の結果から、LIV-1 は EMT 誘導因子であり、ヒト膵癌細胞のさらなる悪性化形質の獲得に関与していることが示唆された。本研究は LIV-1 の膵癌進展への関与に関する研究の基礎となる仕事であり、その意義は深い。本研究論文は、最終審査終了時点で、第一次審査において指摘された不備が適切に修正されており、審査の結果、本論文内容が十分学位に値することが確認された。よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。